



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1518号
学位記番号	第1089号
氏名	春田 真由美
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	Loss of maintenance DNA methylation results in abnormal DNA origin firing during DNA replication Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan 22;469(4):960-6
論文審査担当者	主査： 近藤 豊 副査： 岡本 尚, 中西 真

論文内容の要旨

DNA のメチル化は、ゲノムインプリンティング、X 染色体の不活化および哺乳動物におけるレトロトランスポゾンのサイレンシングなど、遺伝子の発現調節にきわめて重要である。哺乳類の DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (DNMT1) は、複製に伴って生じる未修飾の新生鎖の DNA のメチル化を主に行うメチル基転移酵素である。DNMT1 の働きにより、細胞の DNA のメチル化パターンは維持されている。これまでの研究から、DNMT1 のノックアウト、ノックダウンにより、分化した細胞では著しい増殖能の低下、細胞死を引き起こすことが示されていた。しかし、その詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていなかった。本研究では、コンディショナルに *Dnmt1* をノックアウトすることができるマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いて *Dnmt1* 欠損下において細胞死を引き起こすメカニズムについて検討した。

まず *Dnmt1* を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟み込んだ遺伝子を持つマウスを入手し、そのマウスより得られた胎児から MEF を樹立した。さらに 3T3 プロトコルを用いて不死化し、Cre-ERT2 遺伝子をレトロウイルスを用いて導入することで、タモキシフェン誘導性に *Dnmt1* がノックアウトできる MEF を作成した。

次に、制限酵素を用いたアッセイによって *Dnmt1* 欠損細胞においては DNA メチル化が低下していること、さらに通常 DNA メチル化によって発現が強く抑制されているレトロトランスポゾンの転写が増加していることをリアルタイム PCR を用いて確認した。また、MNase アッセイにより、*Dnmt1* 欠損細胞においてはクロマチンの脱凝集が起きていることが分かった。

Dnmt1 の欠損が細胞周期に与える影響を調べるために、細胞を血清飢餓によりまず G0 期に同調し、10%FBS を加えた後に経時的に回収し、FACS を用いて細胞周期の解析を行った。*Dnmt1* 欠損細胞において細胞周期の進行には大きな異常は認められなかった。しかし、BrdU 抗体を用いた免疫染色を行い、その特徴的な染色パターンから S 期を前期、中期、後期に分けてより詳細に解析したところ、S 期後期の染色パターンを示す細胞の割合が *Dnmt1* 欠損細胞において増加していた。これらの結果から、*Dnmt1* 欠損細胞では、DNA メチル化の低下によりクロマチンの脱凝集がおきることによって、DNA 複製因子が DNA へアクセスしやすくなるなどの変化が生じ、DNA 複製プログラムのタイミングの制御に異常をきたしていることが示唆された。

DNMT1 は N 末端に様々な因子 (転写抑制因子、細胞周期関連因子、Dnmt3a、Dnmt3b、PCNA (proliferating cell nuclear antigen)、リン酸化酵素、DNA 等) と結合する領域と複製フォークのヘミメチル化 DNA での DNMT1 の局在に必須の配列である RFT ドメインを持ち、C 末端に触媒領域を持つ。そこでそれぞれのドメインの重要性を明らかにするために、メチル基転移活性を欠損した DNMT1 の変異体 (DNMT1-C1229S)、複製因子である PCNA との結合モチーフの変異体 (DNMT1-H168R)、また RFT ドメインの一部を欠損させた変異体

(DNMT1- Δ RFT) を *Dnmt1* 欠損細胞に発現させ、S 期における細胞の染色パターンと細胞の増殖能を観察した。その結果、野生型の DNMT1 や DNMT1-H168R を発現させた場合は DNA 複製のタイミングおよび細胞増殖が部分的に回復した。しかし DNMT1-C1229S と DNMT1- Δ RFT を発現させた場合はそれらの回復は認められなかった。DNMT1-C1229S や DNMT1- Δ RFT では DNA メチル化の維持ができず、DNA 複製プログラムのタイミングの異常、ひいては細胞増殖の停止および細胞死を引き起こしたと考えられる。

本研究から、DNMT1 による DNA メチル化の維持は、哺乳動物細胞における DNA 複製の適切な調節に重要であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

【諸言】 DNA は単なる塩基配列による遺伝子情報のみではなく、DNA のメチル化や様々なヒストン修飾を受けついでいくことでその遺伝子発現パターンを維持している。哺乳類の DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (DNMT1) は、複製に伴って生み出される未修飾の新生鎖の DNA のメチル化を主に担っているメチル基転移酵素である。DNMT1 の働きにより、細胞の DNA のメチル化パターンは維持されている。これまでの研究から、DNMT1 のノックアウト、ノックダウンにより、分化した細胞では著しい増殖能の低下、細胞死を引き起こす事が示されていた。しかし、その詳細な機序はほとんど明らかにされていない。本研究では、DNMT1 ノックアウト細胞を用い、DNMT1 欠損下において細胞死を引き起こすメカニズムについて検討した。

【方法】 *Dnmt1* を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟み込んだ遺伝子を持つマウスを入手し、そのマウスより得られた胎児からマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を樹立した。さらに Cre-ERT2 遺伝子をレンチウイルスを用いて導入することで、タモキシフェン誘導性に *Dnmt1* をノックアウトできる MEF を作成した。この *Dnmt1* ノックアウト細胞において、FACS を用いた細胞周期の解析、さらに BrdU 抗体を使用した免疫染色によって S 期を前期、中期、後期に分けてより詳細に解析した。さらに、DNMT1 の酵素活性部位の変異体、ヘミメチル化 DNA へのリクルートに重要といわれている RFT ドメインの一部欠損させた変異体、また複製因子の一つである PCNA 結合モチーフの変異体を *Dnmt1* ノックアウト細胞に入れ戻し、これらのうちどの機能が重要であるか検討した。

【結果】 DNMT1 欠損細胞においては、S 期後期の染色パターンを示す細胞の割合が増加していた。また、MNase アッセイにより、*Dnmt1* 欠損細胞においてはクロマチンの脱凝集が起きていることが示された。DNMT1 の酵素活性と RFT ドメインの変異体による入れ戻しでは S 期後期の染色パターンを示す細胞の蓄積や、細胞増殖の異常がレスキューされなかった。

【考察】 これらの結果から、*Dnmt1* 欠損により、クロマチンの脱凝集がおこり、それによって DNA 複製因子の DNA への結合が変化し、DNA 複製プログラムに異常をきたしていることが示唆された。また、これらの複製タイミングの変化は、細胞増殖にも負の影響を与えていることも確認した。本研究では、DNMT1 による DNA メチル化の維持は、哺乳動物細胞における DNA 複製の適切な調節に重要な役割を果たしていることを示した。

(審査の内容)

主査の近藤教授から、DNA メチル化のアッセイ方法について等 12 項目、第一副査の岡本教授から、RFTS の性質について等 11 項目、第二副査の中西教授から、DNA メチル化の生体における役割等 3 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、細胞生化学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、*Dnmt1* 欠損による DNA 低メチル化が、DNA 複製起点からの複製開始に異常を引き起こすことを明らかにしたもので、DNA 低メチル化によるゲノム不安定性を理解する上で意義のある研究と言える。以上を持って本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 近藤 豊

副査 岡本 尚、 中西 真